کیت اندازه‌گیری T-Uptake در سرم انسان

T-Uptake ELISA Kit 96t Cat. No: 1324-96
T-Uptake ELISA Kit 192T Cat. No: 2224-192

Brochure Rev: 08 (1399/04/07)

مقدمه:

غده تیروئید تحت کنترل و تنظیم هورمون تیروتروپین، ترشح تیروکسین (T4) و تری‌یدوتیرونین (T3) به جریان خون را به عهده دارد. هورمون‌های T3 و T4 به صورت مولکول‌های آزاد در گردش خون حرکت نمی‌کنند و تقریبا ۹۹/۹ درصد آنها به پروتئین‌های ویژه‌ای در سرم متصل هستند. سه نوع از این پروتئین‌ها با ظرفیت و تمایل متفاوت برای اتصال به T3 و T4 از طریق روش الکتروفورز شناخته شده‌اند.

Thyroxine Binding Globulin (TBG)، ۶۵ تا ۷۵ درصد از هورمون‌های تیروئید را در گردش خون، حمل می‌کند.

Thyroxine binding Pre-albumin (TBPA) نیز تمایل متوسطی برای تیروکسین دارد و تقریباً ۱۵ تا ۲۵ درصد از مولکول‌های T4 را حمل می‌کند ولی تمایل بسیار کمی برای اتصال با T3 دارد. آلبومین نیز با تمایل کم ولی ظرفیت بالا، ۱۰ درصد از T4 و ۳۰ درصد از مولکول‌های T3 را حمل می‌کند.

فرایندهای متابولیک به طور کامل توسط هورمون‌های تیروئیدی آزاد تنظیم می‌شوند که ارتباط معکوس با سطح پروتئین‌های اتصالی در خون دارند. به همین دلیل یک روش جهت ارزیابی ظرفیت اتصالی پروتئین‌های سرم در سال ۱۹۷۵ توسعه یافت. در این روش اولیه، T3 رادیواکتیو به خون تام اضافه شد و پس از مدت زمان انکوباسیون، گلبول‌های قرمز تخلیص و میزان رادیواکتیویتی در آنها اندازه‌گیری می‌شد که ارتباط معکوس با ظرفیت اتصالی سرم داشت. ولی محدودیت‌های زیاد این روش، مانع از توسعه آن شد. پس از آن روش‌های پیشرفته‌تری با جایگزینی ترکیباتی نظیر آلبومین، پلیمرها و رزین‌های تعویض یونی به جای گلبول‌های قرمز معرفی شدند. امروزه روش‌های ایمونواسی بویژه روش ELISA با حساسیت بالا جایگزین روش‌های فوق شده‌اند.

اصول آزمایش:

این تست بر پایه ایمونواسی آنزیمی رقابتی (type 5) طراحی شده است. فاز جامد (کف چاهک‌های پلیت) با آنتی‌بادی ضد T4 پوشیده شده است. از طرف دیگر، معرف آنزیمی، حاوی T4 آزاد و T3 متصل به آنزیم HRP می‌باشد.

پروتئین‌های حامل هورمون‌های تیروئیدی در سرم، با توجه به ظرفیت اتصالشان به مقداری از T4 آزاد موجود در معرف آنزیمی متصل می‌شوند ولی قابلیت اتصال به T3 کونژوگه با آنزیم HRP را ندارند. بخشی از T4 آزاد که به پروتئین‌های حامل متصل نشده است، برای اتصال به آنتی‌بادی کف میکروپلیت، با T3 کونژوگه رقابت می‌کنند. بنابراین در هیپوتیروئیدیسم به دلیل سطح پایین هورمون‌های تیروئید، پروتئین‌های حامل نسبتا غیر اشباع هستند و T4 موجود در معرف آنزیمی را بیشتر مصرف می‌کنند. در نتیجه مقدار T4 آزاد کمتری در محیط باقی می‌ماند و رقابت کمتری برای اتصال T3 کونژوگه به کف چاهک‌ها ایجاد می‌کند. در هیپرتیروئیدیسم، فرایندهای فوق برعکس می‌باشند.

پس از تخلیه و شستشوی چاهک‌ها، محلول رنگزا اضافه شده و محصول آبی رنگی تولید می‌شود که پس از افزودن محلول متوقف کننده، به رنگ زرد تغییر رنگ می‌دهد. این محصول در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. در نهایت، میزان T-Uptake سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شده و به سرعت سرم از سلول‌های خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمائید. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.

۲. درب نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد و تا ۳ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

محتویات کیت:

کیت ۱۹۲ تستی	کیت ۹۶ تستی	محتویات کیت
۲ عدد	۱ عدد	میکروپلیت کوت شده با آنتی‌بادی ضد T4 بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.
۱ سری ویال با مقادیر متفاوت	۱ سری ویال با مقادیر متفاوت	کالیبراتورهای T-Uptake در مقادیر ۱۸، ۲۵، ۳۶/۵ و ۴۵ ٪ تهیه شده در سرم انسان
۱ ویال ۲/۵ میلی‌لیتری	۱ ویال ۱/۵ میلی‌لیتری	کونژوگه T-Uptake که حاوی T4 آزاد و T3 متصل به آنزیم در بافر است.
۲ ویال ۱۱ میلی‌لیتری	۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری	بافر رقیق کننده کونژوگه
۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری	۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری	محلول شستشو (۵۰X)
۲ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا A
۲ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا B
۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری	۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری	محلول متوقف کننده واکنش
۲ ورق	۱ ورق	برچسب مخصوص پلیت

توجه: غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید، ممکن است متفاوت باشد و مطابق با مقادیر درج شده بر روی لیبل ویال‌ها و گواهی آنالیز محصول (COA) می‌باشد.

کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱. محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.

۲. کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آنها گذشته است، استفاده ننمایید.

۳. توجه فرمایید محلول‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.

۴. محتویات این کیت با منبع انسانی، از نظر منفی بودن HBsAg، HIV 1/2 و HCV تست شده‌اند. در هر حال هیچ روشی به طور کامل قادر به مشخص کردن منفی بودن موارد فوق نیست. بنابراین لازم است به صورت بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها طبق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.

۵. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است.

۶. در هنگام کار با کیت دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نپاشد و از تماس با دهان و سایر مخاط جدا خودداری گردد.

آماده‌سازی معرف‌ها:

محلول کونژوگه آنزیمی: محلول کونژوگه T-Uptake را با بافر رقیق کننده کونژوگه، به نسبت ۱/۱۰ رقیق کنید. برای مثال ۲۰۰ میکرولیتر از کونژوگه را با ۱/۸ میلی‌لیتر بافر کونژوگه برای ۲۰ چاهک رقیق کنید. این محلول در طی ۲۴ ساعت باید مورد استفاده قرار گیرد.

محلول شستشو: کل محتویات محلول شستشو (۵۰X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.

محلول رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B مخلوط نمایید. محلول فوق بعد از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در محلول رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این محلول استفاده نشود.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه کالیبراتورها، معرف ها، و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) رسیده‌اند. کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمائید.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهدارید.

۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) رقیق شده به هر چاهک اضافه کنید. (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را ملاحظه کنید) و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴. چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه (±۱۰ دقیقه) در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۶. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

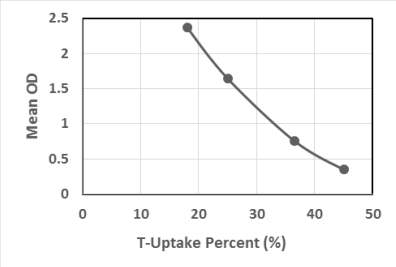
۷. ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸. مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید.

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (%U)
Cal A	A1	2.341	2.370	18
	B1	2.399		
Cal B	C1	1.628	1.643	25
	D1	1.659		
Cal C	E1	0.721	0.757	36.5
	F1	0.794		
Cal D	G1	0.329	0.349	45
	H1	0.369		

توجه: غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید، ممکن است متفاوت باشد و مطابق با مقادیر درج شده بر روی لیبل ویال‌ها و گواهی آنالیز محصول (COA) می‌باشد.



مقادیر مورد انتظار برای میزان
T-Uptake به روش ELISA

Thyroid Status	(٪) T-Uptake
Euthyroid	25 - 35
Hypothyroid or TBG excess binding	< 25
Hyperthyroid or TBG saturation	> 35

پارامترهای کنترل کیفی

Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه کنترل سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean T-UPtake (%)	19.8	29.1	47.2
S.D (%)	0.67	0.83	1.28
C.V (%)	3.4	2.8	2.7

Inter - Assay

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام پذیرفت.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	15	15	15
Mean T-UPtake (%)	20.4	33.6	45.9
S.D (%)	0.84	1.28	1.53
C.V (%)	4.1	3.8	3.3

References:

1. Inada, M., and Sterling, K., J. Clin. Invest, 46, 1442. (1967).
2. Murphy, B. Radioisotopes in Medicine, U.S. Atomic Energy Commission, Technical Information. (1968). Center, Tennessee.
3. Hollander CS and Shenkman L. "Methods of Hormone Radioimmunoassay". Academic Press, New York. (1974).
4. Hamolsky MW, Stein M and Freedberg SA, J Clin Endocrinol, 17, 33. (1957).
5. Hebert V., U.S. Patent Office #3,442,819 (1971).
6. Mitchell M.L., Harden A.B, and O'Rourke ME, J Clin. Endocrinol, 20, 1474. (1960).
7. Rolleri E, Buzzigoli G, and Plassio C, J Nucl Med, 13, 892. (1972).
8. Nusynowitz ML, and Waliszewski AM, J Clin Pathol, 56, 523. (1971).
9. Clark F, and Horn DB, J Clin Endocrinol Metab, 25, 39. (1965).

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

www.idealdiag.com
تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۱۵
تلفن: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹